

食用百合种质资源对枯萎病抗性的鉴定

李润根, 程 华

(宜春学院 生命科学与资源环境学院, 江西省作物生长发育调控重点实验室, 江西 宜春 336000)

摘 要:采用组织分离法和传统的形态学鉴定法获得食用百合枯萎病的致病菌,再分别利用鳞片接种法和离体叶片接菌法鉴定不同食用百合种质资源对枯萎病的抗性能力,以期筛选出抗性强的食用百合种类和品种。结果表明:尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)为食用百合枯萎病的主要致病菌;“兰州”为高抗,“铁炮”“卷丹”“广西高片”“万载柳片”为中抗,“天台山龙牙”“万载中片”“万载高片”“吉安龙牙”为中感;离体叶片接菌法抗性鉴定结果可知“铁炮”与“卷丹”为中抗,“兰州”为中感,其余7种“龙牙”百合品系均表现为高感。

关键词:食用百合;枯萎病;尖孢镰刀菌;抗性鉴定

中图分类号:S 644.102 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)23-0001-06

百合(*Lilium* spp.)属百合科百合属多年生草本球根花卉。百合具有良好的观赏和食用价值,目前对百合的研究主要集中在观赏方面,但其食用价值也越来越受人们重视。食用百合品种稀少,单产较低,并经常受到枯萎病等病害侵染^[1]。百合枯萎病属土传病害,至今还没有有效控制该病害的方法,严重影响食用百合生产,是亟待解决的问题。鉴定筛选出抗性强的食用百合种类、品种,进而利用抗病种质培育抗病新品种是防治食用百合枯萎病的根本途径。彭绿春等^[2]首次利用百合尖孢镰刀菌培养滤液鉴定8种百合组培苗对枯萎病的抗性;詹德智^[3]、李琬玥等^[4]采用不同种镰刀菌人工接种方法对百合进行抗性鉴定。研究不同品种食用百合对镰刀型枯萎病的抗性有助于筛选出不同抗性品种,为食用百合的抗枯萎病育种提供材料,进而可以利用杂交育种、分子育种等途径将抗病性状和基因导入感病植株中,获得

更多不同抗性等级的食用百合品种,丰富食用百合种质资源。该研究采用2种不同的抗性鉴定方法对不同食用百合种质资源进行抗性鉴定,以期筛选出抗性强的食用百合种类和品种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

感染枯萎病的食用百合植株鳞片取自宜春学院校内基地。

用于抗病性鉴定9种食用百合鳞片分别为“铁炮”“兰州”“卷丹”“天台山龙牙”“吉安龙牙”“万载柳片”“万载高片”“万载中片”“广西高片”。

用于离体抗性鉴定的10种食用百合分别为“铁炮”“兰州”“卷丹”“天台山龙牙”“吉安龙牙”“赣州龙牙”和“金瑞龙牙”“隆回龙牙”“邵阳龙牙”“永州龙牙”。取自宜春学院校内基地和倒马岭基地,采集现蕾初期的叶片进行试验。其中“天台山龙牙”为宜春市袁州区天台山乡百合种;“金瑞龙牙”为宜春市袁州区金瑞镇百合种。“天台山龙牙”“吉安龙牙”“万载柳片”“万载高片”“万载中片”“广西高片”“赣州龙牙”和“金瑞龙牙”“隆回龙牙”“邵阳龙牙”和“永州龙牙”均属产地的龙牙百合品系。

第一作者简介:李润根(1966-),男,江西新余人,硕士,副教授,现主要从事蔬菜栽培技术与育种等研究工作。
E-mail:13507058200@163.com.

基金项目:江西省科技厅重点研发资助项目(20151BBF60050,20161BBF60040)。

收稿日期:2017-07-10

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的鉴定、分离及纯化

用组织分离法培养病原菌,具体操作如下:将感病的食用百合鳞片清洗干净(图1),放入超净工作台上灭菌消毒后于病健组织交界部位切取面积约 8 mm^2 的小块鳞片,用无菌滤纸吸干水分,接种于PDA培养基上,倒置在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 光照的恒温箱中培养。待菌丝长满前(图2),挑取组织块边缘菌落的菌丝在显微镜下观察分生孢子的形态。鉴定标准参照张中义^[5]《植物病原真菌学》的分类标准。挑取少量目标菌丝将其转接至PSA培养基上,待菌落生长稳定后,再次重复此操作,反复分离提纯5次,并定期观察菌落生长状况、色泽及其它表观性状。

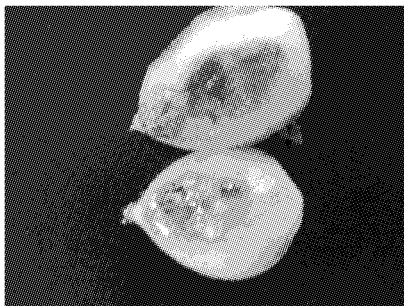


图1 感病食用百合鳞片

Fig.1 Infective edible lily scales



图2 感病鳞片在PDA培养基上培养出的菌落

Fig.2 Colonies of susceptible scales cultured on PDA media

1.2.2 柯赫氏法则验证

用接菌针挑取少量菌丝于PSA培养基上,待菌丝长满后,用无菌打孔器取直径为 10 mm 的菌块5块,接种至已灭菌的 100 mL 珍珠岩里, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 10 d ,制作菌土混合物;然后,将已灭菌的健

康百合鳞片接种于菌土混合物中,置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养,选取出现相同症状的鳞片进行病原菌的再次分离、鉴定。

1.2.3 鳞片接种法抗性鉴定

1)用1.2.2方法制作的菌土混合物与灭菌草炭按 $1:50(\text{v/v})$ 的比例充分混匀, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 14 d 使菌落稳定。2)选择生长健康且相对一致的百合鳞片,用流水冲洗干净后置于超净工作台里进行灭菌消毒处理(注意鳞片基部伤口以外不要造成多余的伤口)。3)将经以上处理的菌土混合物平均分装到3个灭菌塑料盆,将灭菌的鳞片基部朝下扦插到塑料盆中,深度约为鳞片的 $1/3$,间距 2 cm 。将塑料盆置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 光照强度为 $5\text{ }000\text{ lx}$ 、光照时间为 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 的恒温培养箱内培养 64 d 。每个处理10个鳞片,重复3次。观察鳞片发病情况,统计病情指数,病情分级标准参照杨秀梅等^[6]方法。

1.2.4 离体叶片接菌抗性鉴定

1)选取生长状况相对一致且处于现蕾初期的食用百合植株,每植株分上、中、下3个部位摘取叶片,共摘取27片。将采摘的叶片用流水冲洗干净后置于超净工作台用75%的酒精灭菌30s,再用无菌水冲洗3次,无菌滤纸吸干叶片表面的水分。2)将在PSA培养基中生长7d的病原菌用直径 5 mm 的无菌打孔器取菌块待用。3)在已灭菌的、放有滤纸的培养皿中滴加 2 mL 无菌水,然后在培养皿上放3片叶片,叶背朝上,每叶片接种2菌块,盖上培养皿后用保鲜膜封口,置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养,于8d后观察叶片的发病情况,试验设置3次重复。百合枯萎病侵染叶片的分级标准参照张丽丽^[7]的方法,抗病性评价参照何建群等^[8]的标准。

1.3 数据分析

采用SPSS 22和Excel软件对百合病情指数进行统计分析。

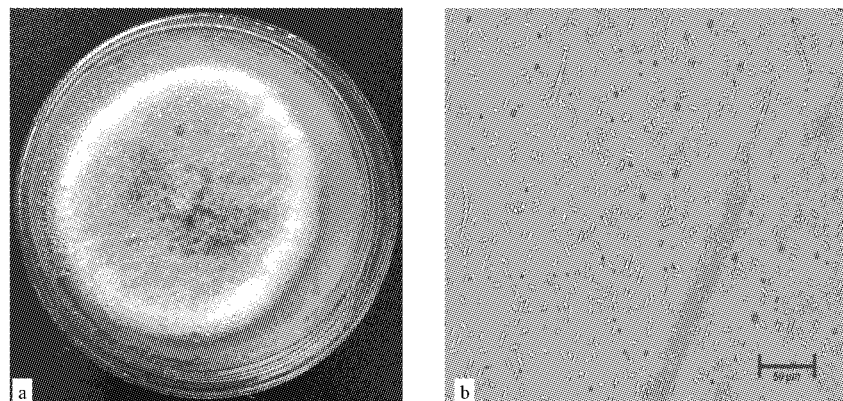
2 结果与分析

2.1 病原菌鉴定结果

经过组织分离、提纯的菌落,在温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 条件下,采用PSA培养基培养其气生菌丝绒毛状,洁白丰厚,培养物中间呈紫色,边

缘呈白色,生长 6 d 的菌落平均直径为 6.3 cm,此时菌落生长相对稳定(图 3a)。在显微镜下观察,病原菌的有大型和小型分生孢子,大型分生孢子呈镰刀型,两端尖削稍弯,中间有 3~5 隔,常见的

为 3 隔,数量较少;小型分生孢子呈无隔短棒状,数量较多(图 3b)。根据以上特征,可鉴定出感病食用百合的病原菌为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。



注:a. 菌落正面;b. 分生孢子。

Note:a. Colony;b. Conidia.

图 3 病原菌形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of pathogen of *F. oxysporum*

2.2 柯赫氏法则验证结果

将分离纯化后的枯萎病病原菌回接健康的食用百合鳞片,出现与基地中感病植株鳞片相同病症。将回接后的感病食用百合鳞片利用组织分离法培养病原菌,其在 PSA 培养基上的表现形状及显微观察孢子的形状与纯化所得菌株相符,由此可判断导致食用百合致病的病原菌为尖孢镰刀菌。

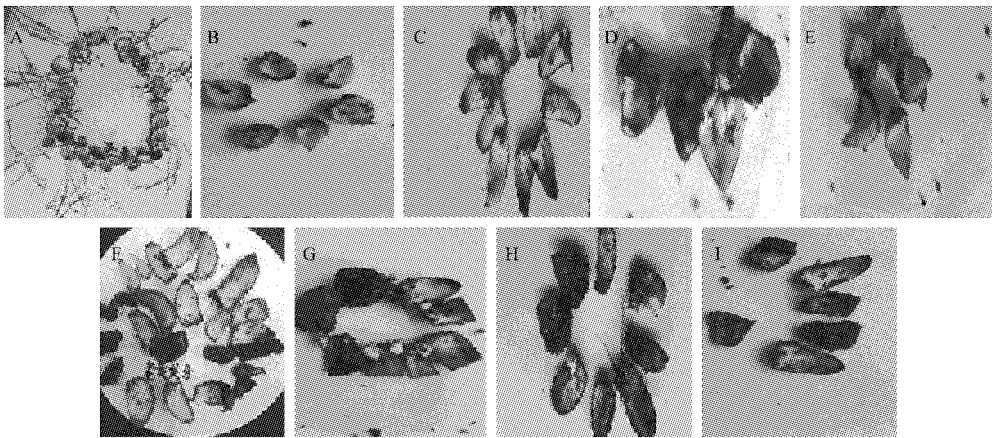
2.3 鳞片接种法抗性鉴定结果

接种 64 d 后观察发现,“兰州”鳞片扦插在菌土后其出苗率和生根率均为 81.3%,“铁炮”鳞片颜色由黄色转为青绿色,后期在鳞片基部长出白色和嫩绿色的小鳞茎,但其外在的鳞片空瘪,养分消耗殆尽,感病鳞片较少;“卷丹”“广西高片”和“万载柳片”基部全部腐烂,但腐烂面积较小;“万载高片”“万载中片”“吉安龙牙”和“天台山龙牙”鳞片大部分腐烂,自基部延伸。由表 1 可知,“兰州”的抗性最强,病情指数为 12.00,表现为高抗;其次是“铁炮”“广西高片”“卷丹”和“万载柳片”,

病情指数分别为 20.60、35.45、44.20 和 46.00,表现为中抗;最后是“天台山龙牙”“万载中片”“万载高片”和“吉安龙牙”,病情指数分别为 52.70、54.00、54.40 和 58.00,表现为中感(图 4、表 1)。

2.4 离体叶片抗性鉴定结果

10 种食用百合离体叶片接菌 8 d 后观察发现,“铁炮”与“卷丹”百合叶片上所接菌块边缘有水浸状湿腐,病菌侵染面积较小;兰州叶片较窄,其总宽度仅为 4 mm,菌块部分面积覆盖在叶片之上,叶片腐烂面积较大;“金瑞龙牙”“赣州龙牙”“永州龙牙”“隆回龙牙”“吉安龙牙”“天台山龙牙”“邵阳龙牙”叶片腐烂面积占 2/3 以上。由表 2 可知,“铁炮”和“卷丹”的抗病性最强,相对抗性指数分别为 0.42 和 0.41,都表现为中抗;“兰州”抗性次之,相对抗性指数为 0.26,表现为中感;“金瑞龙牙”“赣州龙牙”“永州龙牙”“隆回龙牙”“吉安龙牙”“天台山龙牙”“邵阳龙牙”的相对抗性指数分别为 0.14、0.08、0.03、0.00、0.00、0.05 和 0.02,均表现为高感(表 2、图 5)。



注: A. “兰州”; B. “铁炮”; C. “广西高片”; D. “卷丹”; E. “万载柳片”; F. “天台山龙牙”; G. “万载中片”; H. “万载高片”; I. “吉安龙牙”。

Note: A. *L. davidii* var. *unicolor*; B. *L. longiflorum*; C. ‘Guangxi’ lily; D. *L. lancifolium*; E. ‘Liupian’ lily; F. ‘Tiantaishan’ lily; G. ‘Zhongpian’ lily; H. ‘Gaopian’ lily; I. ‘Ji’an Longya’.

图 4 百合鳞片接种尖孢镰刀菌 64 d 后的情况

Fig. 4 Lily scales inoculated with *F. oxysporum* after 64 days

表 1 鳞片接种法对百合尖孢镰刀菌的抗性结果

Table 1 Resistance identification result to *F. oxysporum* via scale inoculation method

品种/种 Species/Cultivar	病情指数 Disease index	相对抗性指数 Relative resistances index	抗性 Resistance
“兰州” <i>L. davidii</i> var. <i>unicolor</i>	12. 00Aa	0. 79	HR
“铁炮” <i>L. longiflorum</i>	20. 60ABab	0. 64	MR
“广西高片” ‘Guangxi’ lily	35. 45ABab	0. 39	MR
“卷丹” <i>L. lancifolium</i>	44. 20Bab	0. 24	MR
“万载柳片” ‘Liupian’ lily	46. 00Bab	0. 21	MR
“天台山龙牙” ‘Tiantaishan’ lily	52. 70Bb	0. 09	MS
“万载中片” ‘Zhongpian’ lily	54. 00Bb	0. 07	MS
“万载高片” ‘Gaopian’ lily	54. 40Bb	0. 06	MS
“吉安龙牙” ‘Ji’an Longya’	58. 00Bb	0. 00	MS

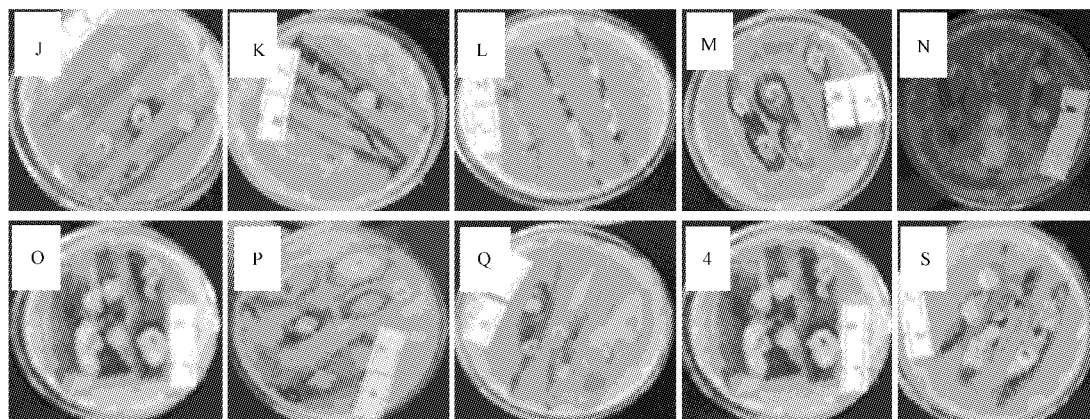
注: 小写字母表示 5% 显著水平, 大写字母表示 1% 显著水平, 下表同。

Note: Values with different lowercase letters mean significant difference ($P<0. 05$); and with different capital letters mean extremely significant difference ($P<0. 01$); the same below.

表 2 离体叶片接菌法的抗性鉴定结果

Table 2 Resistance identification result to *F. oxysporum* via leaf inoculation method

品种/种 Species/Cultivar	病情指数 Disease index	相对抗性指数 Relative resistances index	抗性 Resistance
“铁炮” <i>L. longiflorum</i>	58. 35Aa	0. 42	MR
“卷丹” <i>L. lancifolium</i>	59. 41Aa	0. 41	MR
“兰州” <i>L. davidii</i> var. <i>unicolor</i>	74. 43Bb	0. 26	MS
“金瑞龙牙” ‘Jinrui’ lily	85. 90BCc	0. 14	HS
“赣州龙牙” ‘Ganzhou’ lily	91. 70Ccd	0. 08	HS
“天台山龙牙” ‘Tiantaishan’ lily	95. 40Ccd	0. 05	HS
“永州龙牙” ‘Yongzhou’ lily	97. 20Cd	0. 03	HS
“邵阳龙牙” ‘Shaoyang’ lily	98. 10Cd	0. 02	HS
“隆回龙牙” ‘Longhui’ lily	100. 00Cd	0. 00	HS
“吉安龙牙” ‘Ji’an Longya’	100. 00Cd	0. 00	HS



注:J. “铁炮”;K. “卷丹”;L. “兰州”;M. “金瑞龙牙”;N. “赣州龙牙”;O. “天台山龙牙”;P. “永州龙牙”;Q. “邵阳龙牙”;R. “隆回龙牙”;S. “吉安龙牙”。

Note:J. *L. longiflorum*; K. *L. lancifolium*; L. *L. davidii* var. *unicolor*; M. ‘Jinrui’ lily; N. ‘Ganzhou’ lily; O. ‘Tiantaishan’ lily; P. ‘Yongzhou’ lily; Q. ‘Shaoyang’ lily; R. ‘Longhui’ lily; S. ‘Ji’an Longya’.

图 5 10 种食用百合离体叶片接菌 8 d 后的感病情况

Fig. 5 Susceptibility of 10 kinds of edible lily leaves after inoculation for 8 days

3 结论与讨论

该试验采用常规组织分离法和传统的形态学鉴定相结合的方法得出引起食用百合枯萎病的主要致病菌为尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*),这与李琬玥等^[4]和赵彦杰^[9]的研究结果相一致。

改良鳞片接种法鉴定的结果是“兰州”为高抗,“铁炮”“卷丹”“广西高片”“万载柳片”为中抗,“万载高片”“万载中片”为中感,“兰州”“卷丹”栽培种抗性与杨秀梅等^[6]对其野生种研究结果相符,龙牙百合野生种抗性有待进一步研究;离体叶片接菌法抗性鉴定结果得到“铁炮”与“卷丹”为中抗,“兰州”为中感,“赣州龙牙”“永州龙牙”“隆回龙牙”“邵阳龙牙”“吉安龙牙”“金瑞龙牙”和“天台山龙牙”为高感,不同龙牙百合品系抗性有一定差异。试验表明,“卷丹”和“铁炮”的抗性鉴定结果在 2 种不同的鉴定方法中表现一致,都为中抗;在鳞片接种法中,“兰州”表现为高抗,“吉安龙牙”“天台山龙牙”为中感,而在离体叶片接菌法中“兰州”为中感,“吉安龙牙”“天台山龙牙”为高感,出现这种不同抗性的鉴定结果可能是病原菌接种在

鳞片与叶片 2 个不同部位所致。百合枯萎病为土传病害,对鉴定为鳞片抗病,叶片不抗病的百合品种,生产上是否只需要更多的注意预防其叶部病害及其机理等相关情况有待进一步研究。

参考文献

- [1] 潘其辉,朱业斌,丁益清. 万载县百合产业现状与发展对策[J]. 安徽农业科学,2013,41(15):6969-6970.
- [2] 彭绿春,杨秀梅,苏艳,等. 应用尖孢镰刀菌培养液室内鉴定百合品种抗病性研究[J]. 江西农业大学学报,2011,33(2):275-277.
- [3] 詹德智. 百合对镰刀菌茎腐病的抗性评价[D]. 南京:南京林业大学,2012.
- [4] 李琬玥,刘正坪,何祥凤,等. 百合枯萎病病原菌的分离、鉴定及致病性研究[J]. 沈阳农业大学学报,2016,47(2):153-158.
- [5] 张中义. 植物病原学[M]. 成都:四川科技出版社,1986.
- [6] 杨秀梅,瞿素萍,吴学尉,等. 百合种质资源对百合枯萎病抗性鉴定[J]. 西南大学学报(自然科学版),2010,32(6):31-34.
- [7] 张丽丽. 百合枯萎病研究[D]. 保定:河北农业大学,2013.
- [8] 何建群,陈贵芸,李靖军,等. 亚麻品种白粉病田间抗病性分析[J]. 中国麻业科学,2007,29(3):141-144.
- [9] 赵彦杰. 食用百合茎腐病的发生规律及综合防治[J]. 中国蔬菜,2005,25(8):50-52.

Resistance Identification of Edible Lily Germplasm Resources to *Fusarium* Wilt Disease

LI Rungen, CHENG Hua

(College of Life Science Environment and Resource, Yichun University/Jiangxi Key Laboratory of Crop Growth Regulation, Yichun, Jiangxi 336000)

Abstract: By using tissue isolation method and the traditional morphological identification method to discover the pathogen causing *Fusarium* wilt disease on edible lily, and then the disease resistance of different edible lily germplasm resources was identified by scale inoculation and detached leaves after inoculating pathogen, in order to screen out the strong resistance to consumption of lily species and varieties. The results showed that *Fusarium oxysporum* was the main pathogen of edible lily wilt disease; the results of identification of scale inoculation was *L. davidii* var. *unicolor* was high resistance, *Lilium longiflorum*, *L. lancifolium*, 'Guangxi' lily, 'Liupian' lily were middle resistance, 'Tiantaishan' lily, 'Zhongpian' lily, 'Gaopian' lily, 'Ji'an Longya' were middle sense; the results of resistant identification by the method of inoculating pathogen on leaves *in vitro* were *Lilium brownii* var. *viridulum*, *L. lancifolium* were middle resistance, *L. davidii* var. *unicolor* was middle sense, seven other kinds of 'Longya' lily were all high sense.

Keywords: edible lily; *Fusarium* wilt disease; *Fusarium oxysporum*; resistance identification

欢迎订阅 2018 年《中国农业科学》

《中国农业科学》是由农业部主管、中国农业科学院与中国农学会共同主办的综合性学术期刊,是中文核心期刊、中国科技核心期刊、中国精品科技期刊、CSCD Q1 区期刊、中国权威学术期刊 A⁺ 期刊、中国最具国际影响力学术期刊,是了解中国农业相关领域科研进展的首选期刊。《中国农业科学》以研究论文、综述、简报等形式报道农牧业基础科学和应用基础科学最新成果。设有作物遗传育种·种质资源·分子遗传学;耕作栽培·生理生化·农业信息技术;植物保护;土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境;园艺;食品科学与工程;畜牧·兽医·资源昆虫等栏目。读者对象为国内外农业科研院(所)、大专院校的科研、教学与管理人员。

《中国农业科学》大 16 开,每月 1、16 日出版,国内外公开发行。每期 208 页,定价 49.50 元,全年定价 1 188.00 元。国内统一连续出版物号:CN11-1328/S,国际标准连续出版物号:ISSN 0578-1752,邮发代号:2-138,国外代号:BM43。

《中国农业科学》全国各地邮局均可订阅,也可直接向编辑部订购。

地 址:北京中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部

电 话:010-82109808,82106281

网 址:www.ChinaAgriSci.com

联系人:林鉴非

邮编:100081

传真:010-82106247

E-mail:zgnykx@caas.cn